



AK

PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類7 A61K 45/00, 31/661, A61P 27/00, C07F 9/09</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO00/41729</p> <p>(43) 国際公開日 2000年7月20日(20.07.00)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP00/00095</p> <p>(22) 国際出願日 2000年1月12日(12.01.00)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平11/5420 1999年1月12日(12.01.99) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 参天製薬株式会社 (SANTEN PHARMACEUTICAL CO., LTD.)(JP/JP) 〒533-8651 大阪府大阪市東淀川区下新庄3丁目9番19号 Osaka, (JP)</p> <p>(71) 出願人 ; および</p> <p>(72) 発明者 西田輝夫(NISHIDA, Teruo)(JP/JP) 〒750-0151 山口県宇部市大字西岐波396番地の2 Yamaguchi, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および</p> <p>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 中田勝彦(NAKATA, Katsuhiko)(JP/JP) 〒633-0072 奈良県桜井市大字箸中531番地の1 Nara, (JP) 中村雅胤(NAKAMURA, Masatsugu)(JP/JP) 〒631-0074 奈良県奈良市三松2丁目12番3-205号 Nara, (JP)</p>		<p>(74) 代理人 弁理士 岸本瑛之助, 外(KISHIMOTO, Einosuke et al.) 〒542-0086 大阪府大阪市中央区西心斎橋1丁目13番18号 イナバビル3階 Osaka, (JP)</p> <p>(81) 指定国 CA, CN, KR, NO, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: REMEDIES FOR CORNEAL DISORDERS</p> <p>(54)発明の名称 角膜障害治療剤</p> <p>(57) Abstract Remedies for corneal disorders which contain as the active ingredient compounds having an effect of activating Rho (for example, corneal epithelium extension promoters). The compounds having the effect of activating Rho are exemplified by lysophatidic acid and acyl derivatives thereof. The corneal disorders are exemplified by a corneal ulcer, corneal epithelium scraping, corneitis and dry eye.</p>		

(57)要約

本発明は、R h o 活性化作用を有する化合物を有効成分とする角膜障害治療剤、たとえば角膜上皮伸展促進剤を提供するものである。R h o 活性化作用を有する化合物は、たとえばリゾホスファチジン酸またはそのアシル誘導体である。角膜障害は、たとえば角膜潰瘍、角膜上皮剥離、角膜炎、ドライアイである。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AG	アンティグア・バーブーダ	DZ	アルジェリア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AL	アルバニア	EE	エストニア	LJ	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AU	オーストラリア	FR	フランス	LS	レソト	SK	スロヴァキア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LV	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BB	バルバドス	GDE	グレナダ	MA	モロッコ	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GE	グルジア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MD	モルドヴァ	TM	トルクメニスタン
BG	ブルガリア	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TR	トルコ
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TT	トリニダード・トバゴ
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサウ		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
BY	ベラルーシ	HR	クロアチア	ML	マリ	TZ	タンザニア
CA	カナダ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CF	中央アフリカ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CG	コンゴ	IE	アイルランド	MW	マラウイ	US	米国
CH	スイス	IL	イスラエル	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CI	コートジボワール	IN	インド	MZ	モザンビーク	VN	ヴェトナム
CM	カメルーン	IS	アイスランド	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラヴィア
CN	中国	IT	イタリア	NL	オランダ	ZA	南アフリカ共和国
CR	コスタ・リカ	JP	日本	NO	ノルウェー	ZW	ジンバブエ
CU	キューバ	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド		
CY	キプロス	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
CZ	チェッコ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DE	ドイツ	KR	韓国	RO	ルーマニア		
DK	デンマーク						

明 細 書

角膜障害治療剤

5 技術分野

本発明はリゾホスファチジン酸またはそのアシル誘導体等の R h o 活性化作用を有する化合物を有効成分とした、角膜上皮伸展の促進作用を有する角膜障害治療剤に関するものである。

10

背景技術

角膜は直径約 1 c m、厚さ約 1 m m の透明な無血管の組織である。角膜の透明性は視機能に重要な影響を与えており、角膜における種々の生理生化学的現象は、主として角膜の透
15 明性の維持ということを目的として機能している。

角膜潰瘍、角膜上皮剥離、角膜炎またはドライアイ等の種々の疾患により引き起こされた角膜上皮欠損は、混合感染の併発がなければ自然に修復する。しかし、何らかの理由で修復が遅延したりあるいは修復が行われずに上皮欠損が遷延化
20 すると、上皮の正常な構築に悪影響を与えるのみならず、実質や内皮の構造や機能まで害される。従来からの治療法の原理は、外界の刺激から角膜表面を保護することにより自然に上皮が伸展して欠損部の再被覆をはかるという受動的なものである。近年、細胞生物学の発展に伴い、細胞の分裂・移動
25 ・接着・伸展等に関与する因子が解明されており、角膜上皮欠損の修復には、角膜上皮の伸展を促進する化合物が重要な役割を担うことが報告されている（臨眼，46，738-743（1992）、眼科手術，5，719-727（1992））。

ところで、細胞は外界シグナルに応答して、細胞骨格や細胞接着装置をダイナミックに変化させて外界環境に適応させる。細胞骨格を形成する主要構成成分は、アクチン等からなるマイクロフィラメント、チューブリン等からなる微小管、
5 ケラチン等からなる中間径フィラメントの3種類の線維構造である。これらは互いに密接に関係しながら、細胞接着、細胞形態、細胞質分裂、細胞の極性形成等の高次機能を担っている。

このうち、アクチン-マイクロフィラメント系の細胞骨格
10 を制御していると考えられているのが、低分子量GTP結合タンパクのサブファミリーの1つであるRhoファミリーである。Rhoファミリーは、Rho、Rac、Cdc42等のメンバーから構成されており、細胞増殖因子等の細胞外シグナルの下流で作用している。最近、Rhoに特異的な標的
15 タンパクが同定され、細胞骨格と接着の制御機構（実験医学，16，1782-1788（1998））や細胞運動の制御機構（実験医学，16，2032-2039（1998））等、細胞現象の制御メカニズムが明らかにされつつある。

一方、Rhoを特異的に活性化させる化合物としてリゾホスファチジン酸またはそのアシル誘導体が知られている（Ce
20 ll, 70，389-399（1992））。リゾホスファチジン酸またはそのアシル誘導体についてはさまざまな作用が報告されている。例えば、細胞とフィブロネクチンの結合を促進して細胞形態を調節すること（J. Cell Biol., 127，1447-1459（1994））、
25 皮膚創傷時におけるフィブロネクチンの上皮細胞および内皮細胞への結合を促進すること（アメリカ特許5480877号明細書）、グリコサミノグリカン産生促進作用を有する皮膚活性化剤であり、化粧品および皮膚老化防止外用剤として

有用であること（国際特許公開WO 95 / 3 5 0 9 0号公報）、乾癬などで生じる上皮細胞の過増殖を抑制すること（アメリカ特許5 5 6 5 4 3 9号明細書）、マクロファージを活性化し腫瘍における細胞壊死を抑制すること（アメリカ特許5 1 4 9 5 2 7号明細書）、アポトーシスを阻害し細胞の機能を維持または回復すること（国際特許公開WO 9 8 / 4 1 2 1 3号公報）等がある。

眼科領域においては、網膜色素上皮細胞の増殖を促進すること（Curr. Eye Res., 16, 698-702 (1997)）、培養水晶体
10 上皮細胞においてC a イオンの流入を促進すること（Cell. Signal., 9, 609-616 (1997)）、角膜障害時に房水中のリゾホスファチジン酸またはそのアシル誘導体の量が増加することおよび正常な角膜実質細胞の増殖を促進すること（Am. J. Physiol., 274, C1065-C1074 (1998)）等が報告されている。

15 しかしながら、R h oと角膜上皮細胞との関係については報告されておらず、角膜上皮欠損の修復と深い関係がある角膜上皮の移動機構に対するR h o活性化作用を有する化合物の効果は無論知られていない。

20 上記のように、細胞現象の制御メカニズムに関与する低分子量G T P結合タンパクであるR h oの角膜上皮の移動機構への関与の研究を通じて、R h o活性化作用を有する化合物の角膜障害に対する作用、特に角膜上皮伸展に対する作用を調べることは非常に興味ある課題であった。

25

本発明者等はR h oの角膜上皮の移動機構への関与を検討するために、まずR h o阻害剤の角膜上皮に及ぼす影響を検討した。その結果、R h o阻害剤によって角膜上皮の伸展は

完全に抑制され、角膜上皮の移動機構には低分子量 G T P 結合タンパクである R h o による細胞内骨格系タンパクの制御が関与していることが明らかとなった。

次に、R h o 活性化作用を有する化合物の角膜上皮に対する効果を検討したところ、優れた角膜上皮伸展に対する促進作用を有することを見いだした。

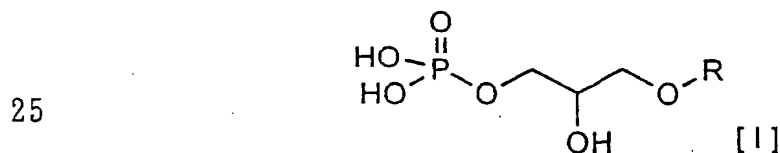
さらに、R h o 活性化作用を有する化合物と R h o 阻害剤を併用したところ、上記の角膜上皮伸展の促進はほぼ完全に抑制され、角膜上皮伸展に対する促進作用は、R h o 活性化作用に基づくものであることが確認された。

以上のことから、R h o 活性化作用を有する化合物が優れた角膜上皮伸展促進作用を有し、種々の要因により角膜が損傷を受けた状態にある角膜潰瘍、角膜上皮剥離、角膜炎またはドライアイ等の角膜障害の治療剤として有用であることが明らかとなった。

発明の開示

本発明における R h o 活性化作用を有する化合物とは、R h o が関与している細胞現象の制御メカニズムを亢進させる化合物を示す。

本発明におけるリゾホスファチジン酸またはそのアシル誘導体とは下記一般式 [I] で表わされる化合物を示す。



[式中、R は水素原子またはアシル基を示す。]

本発明におけるアシル基とは、飽和もしくは不飽和の脂肪

族カルボニル基または芳香族カルボニル基を示すが、好ましくは飽和もしくは不飽和の脂肪族カルボニル基で、より好ましくは炭素数 6 以上の高級脂肪族カルボニル基で、特に好ましい例はオレオイル基およびステアロイル基である。

- 5 本発明における角膜障害とは、種々の要因により角膜が損傷を受けた状態にある角膜潰瘍、角膜上皮剥離、角膜炎、ドライアイ等をいう。

R h o の角膜上皮の移動機構への関与を検討すべく、R h o 阻害剤ならびに R h o 活性化作用を有する化合物の角膜上皮に対する作用を検討した。詳細については後述の薬理試験の項で示すが、R h o 阻害剤として知られているボツリヌス菌の菌体外酵素である C 3 酵素（以下、Exoenzyme C3 とする）（Cell, 70, 389-399 (1992)）によって角膜上皮の伸展はほぼ完全に抑制されることを認めた。

- 15 このことから、角膜上皮の移動機構には低分子量 G T P 結合タンパクである R h o が関与していることが明らかとなった。

次に、R h o 活性化作用を有する化合物の代表的な化合物であるリゾホスファチジン酸またはそのアシル誘導体の角膜上皮伸展に対する効果を検討したところ、リゾホスファチジン酸またはそのアシル誘導体が角膜片の組織培養系における角膜上皮の伸展を促進することを見いだした。さらに、この角膜上皮伸展促進作用は Exoenzyme C3 によってほぼ完全に抑制されることが認められ、リゾホスファチジン酸またはそのアシル誘導体の有する角膜上皮伸展促進作用は R h o 活性化作用に基づくものであることが確認された。これらのことから、R h o 活性化作用を有する化合物は、優れた角膜上皮伸展促進作用を有し、角膜障害、すなわち種々の要因により角膜が損傷を受けた状態にある角膜潰瘍、角膜上皮剥離、角

膜炎、ドライアイ等の治療に有用であることが明らかとなった。

R h o 活性化作用を有する化合物は、経口でも、非経口でも投与することができる。投与剤型としては、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、注射剤、点眼剤等が挙げられ、特に点眼剤が好ましい。これらは汎用されている技術を用いて製剤化することができる。例えば、点眼剤は、塩化ナトリウム、濃グリセリン等の等張化剤、リン酸ナトリウム、酢酸ナトリウム等の緩衝化剤、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレート、ステアリン酸ポリオキシシル 40、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油等の界面活性剤、クエン酸ナトリウム、エデト酸ナトリウム等の安定化剤、塩化ベンザルコニウム、パラベン等の防腐剤等を必要に応じて用い調製することができる。

p H は眼科製剤に許容される範囲内にあればよいが、4 ~ 8 の範囲が好ましい。眼軟膏は、白色ワセリン、流動パラフィン等の汎用される基剤を用いて調製することができる。また、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤等の経口剤は、乳糖、結晶セルロース、デンプン、植物油等の増量剤、ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリビニルピロリドン等の結合剤、カルボキシメチルセルロース カルシウム、低置換ヒドロキシプロピルメチルセルロース等の崩壊剤、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、マクロゴール、シリコン樹脂等のコーティング剤、ゼラチン皮膜等の皮膜剤などを必要に応じて加えて調製することができる。

投与量は症状、年齢、剤型等によって適宜選択できるが、点眼剤であれば 0.0001 ~ 1 % (w/v)、好ましくは 0.001 ~ 1 % (w/v) のものを 1 日 1 ~ 数回点眼すれ

ばよい。また、経口剤であれば通常1日当り0.1～5000mg、好ましくは1～1000mgを1回または数回に分けて投与すればよい。

- 以下に、製剤例および薬理試験の結果を示すが、これらの例は本発明をよりよく理解するためのものであり、本発明の範囲を限定するものではない。

発明を実施するための最良の形態

[製剤例]

- 10 Rh o活性化作用を有する化合物としてオレオイル リゾホスファチジン酸（以下、オレオイルLPAという）を用いた代表的な製剤例を以下に示す。

1. 点眼剤

以下の処方例の点眼剤を汎用される方法を用いて調製した。

- 15 処方例1（点眼液）

100ml中

	オレオイルLPA	1mg
	塩化ナトリウム	900mg
	水酸化ナトリウム	適量
20	塩酸	適量
	滅菌精製水	適量

- 処方例1と同様にして、必要に応じて界面活性剤や安定化剤を加えて、オレオイルLPAを100ml中5mg、10mg、50mg、100mg、500mg、1000mg含有する点眼液を調製することができる。

処方例 2 (眼軟膏)

100 g 中

オレオイル L P A

100 mg

白色ワセリン

90 g

5

流動パラフィン

適量

処方例 2 と同様に、オレオイル L P A を 1 mg、5 mg、10 mg、50 mg 含有する眼軟膏を調製することができる。

10

処方例 3 (錠剤)

100 mg 中

オレオイル L P A

10 mg

乳糖

59.4 mg

15

トウモロコシデンプン

20 mg

カルボキシメチルセルロース カルシウム 6 mg

ヒドロキシプロピルセルロース 4 mg

ステアリン酸 マグネシウム 0.6 mg

20 上記処方の錠剤に、ヒドロキシプロピルセルロース等のコーティング剤 2 mg を用いてコーティングを施し、目的とするコーティング錠を得ることができる。

処方例 3 と同様に、オレオイル L P A を 100 mg 中 0.1 mg、0.5 mg、1 mg、5 mg、50 mg 含有す

25 る錠剤を得ることができる。

[薬理試験]

角膜上皮伸展に対する作用 (in vitro)

雄性日本白色ウサギの角膜を用い、Nishida らの方法 (J. Cell Biol., 97, 1653-1657 (1983)) に準じ、角膜片の組織培養系での角膜上皮伸展長を指標にして角膜上皮伸展に対する下記被験化合物の影響を検討した。

5 (実験方法)

ウサギ角膜片より切り出した角膜ブロックを、被験化合物を含む培養液 (TC-199) 中、 37°C ・ $5\% \text{CO}_2$ の条件下で24時間培養した。培養後、角膜ブロックをエタノール-氷酢酸 (容積比95:5) 混合液中で固定し、パラフィンで包埋して切片を作製した。切片を脱パラフィンした後、ヘマトキシリン-エオジン染色し、顕微鏡下で上皮細胞層の伸展長を測定した。

コントロールとしては被験化合物を含まない培養液で同様に培養したものを用いた。

15 (結果1)

Rho阻害剤である Exoenzyme C3 を被験化合物として含む培養液で培養したときの結果を表1に示す。

表 1

	伸展長 (μm)
20 コントロール	454
Exoenzyme C3 ($2\mu\text{g}/\text{ml}$)	186

(表中のデータは6例の平均値)

表1から判るように、Rho阻害剤である Exoenzyme C3 を含む培養液で培養をすると、角膜上皮の伸展はほぼ完全に抑制され、角膜上皮伸展にRhoが関与していることが明らかとなった。

(結果2)

$0.02\mu\text{M}$ 、 $0.2\mu\text{M}$ および $2\mu\text{M}$ の濃度のオレオイ

ル L P A を被験化合物として含む培養液で培養したときの結果を表 2 に示す。

表 2

5		伸展長 (μ m)
	コントロール	4 5 4
	オレオイル L P A (0 . 0 2 μ M)	5 2 8
	(0 . 2 μ M)	6 5 8
	(2 μ M)	7 1 2

(表中のデータは 6 例の平均値)

- 10 表 2 から判るように、オレオイル L P A を含む培養液で培養をすると、角膜上皮の伸展が濃度依存的に顕著に促進されることが認められた。

(結果 3)

- 15 被験化合物として Exoenzyme C3 をオレオイル L P A とともに培養液に添加したときの結果を表 3 に示す。

表 3

20		伸展長 (μ m)
	コントロール	4 5 4
	Exoenzyme C3 (2 μ g / m l)	
	+オレオイル L P A (0 . 0 2 μ M)	1 8 5
	+オレオイル L P A (0 . 2 μ M)	1 8 2
	+オレオイル L P A (2 μ M)	1 9 8

(表中のデータは 6 例の平均値)

- 25 表 3 から判るように、R h o 阻害剤である Exoenzyme C3 をオレオイル L P A とともに培養液に添加すると、角膜上皮の伸展はほぼ完全に抑制された。

これらのことから、角膜上皮伸展促進作用は R h o の活性化作用に基づくものであることが確認された。

上記の薬理試験から、R h o 活性化作用を有する化合物が優れた角膜上皮伸展促進作用を有し、角膜上皮の創傷治癒促進作用を通じて、種々の要因により角膜が損傷を受けた状態にある角膜潰瘍、角膜上皮剥離、角膜炎またはドライアイ等の角膜障害の治療剤として有用であることが見いだされた。

産業上の利用可能性

本発明は、R h o 活性化作用を有する化合物を有効成分とする角膜障害治療剤、たとえば角膜上皮伸展促進剤に関するものである。

15

20

25

請求の範囲

1. R h o 活性化作用を有する化合物を有効成分とする角膜障害治療剤。

5

2. R h o 活性化作用を有する化合物がリゾホスファチジン酸またはそのアシル誘導体である請求項 1 記載の角膜障害治療剤。

10

3. リゾホスファチジン酸のアシル誘導体がオレオイルリゾホスファチジン酸である請求項 2 記載の角膜障害治療剤。

4. 角膜障害が角膜潰瘍、角膜上皮剥離、角膜炎またはドライアイである請求項 1 から請求項 3 のいずれかに記載の角膜障害治療剤。

15

5. R h o 活性化作用を有する化合物を有効成分とする角膜上皮伸展促進剤。

20

25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/00095

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ A61K45/00, A61K31/661, A61P27/00, C07F9/09

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ A61K45/00, A61K31/661, A61P27/00, C07F9/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LILIOM, K., et al., 'Growth factor-like phospholipids generated after corneal injury' Am. J. Phys., 1998, Vol.274, 4 Pt 1, p.C1065-74, cited in the present application, see abstract, page C1073, right column, Par. Nos. 2-3	1 - 5
X Y	SUNDARRAJ, N., et al., 'A Rho-associated protein kinase: differentially distributed in limbal and corneal epithelia' Investigative Ophthalmology and Visual Science, 1998, Vol.39, No.7, p.1266-72, Discussion (especially, see page 1270, right column, lines 27-33; page 1271, right column, lines 12-15)	1, 2, 4, 5 3
Y	CHYZANOWSKA-WODNICKA, M., et al., 'Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions' J. Cell Biol., 1996, Vol.133, No.6, p.1403-15, see page 1403, right column, line 13 to page 1404, left column, line 28	1 - 5
A	SUNDARRAJ, M., et al., 'Nuclear translocation of a Rho-A binding serine/threonine kinase (ROCK-I) is associated with corneal epithelial proliferation in vitro'	1 - 5

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
07 March, 2000 (07.03.00)Date of mailing of the international search report
21 March, 2000 (21.03.00)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/00095

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	Investigative Ophthalmology and Visual Sciences, 1998, Vol.39, No.4, p. S201, Full text	

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ' A61K45/00, A61K31/661, A61P27/00, C07F9/09

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ' A61K45/00, A61K31/661, A61P27/00, C07F9/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	LILIOM, K., et al., 'Growth factor-like phospholipids generated after corneal injury' Am. J. Phys., 1998, Vol.274, 4 Pt 1, p.C1065-74, 本願中に引用, 要約及び第C1073頁右欄第2-3段落参照	1 - 5
X Y	SUNDARRAJ, N., et al., 'A Rho-associated protein kinase: differentially distributed in limbal and corneal epithelia' Investigative Ophthalmology and Visual Science, 1998, Vol.39, No.7, p.1266-72, Discussion (特に第1270頁右欄第27-33行及び第1271頁右欄第12-15行) 参照	1, 2, 4, 5 3

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

07.03.00

国際調査報告の発送日

21.03.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

大宅 郁治



4 C

9639

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	CHRZANOWSKA-WODNICKA, M., et al., 'Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions' J. Cell Biol., 1996, Vol.133, No.6, p.1403-15, 第1403頁右欄第13行-第1404頁左欄第28行参照	1 - 5
A	SUNDARRAJ, M., et al., 'Nuclear translocation of a Rho-A binding serine/threonine kinase (ROCK-I) is associated with corneal epithelial proliferation in vitro' Investigative Ophthalmology and Visual Sciences, 1998, Vol.39, No.4, p.S201, 全文参照	1 - 5

REMEDIES FOR CORNEAL DISORDERS

Claims of corresponding document: **EP1142585**

1. A therapeutic agent for a corneal disorder comprising a compound having an effect of activating Rho as an active ingredient.
2. The therapeutic agent for the corneal disorder as claimed in claim 1, wherein the compound having the effect of activating Rho is lysophosphatidic acid or an acyl derivative thereof.
3. The therapeutic agent for the corneal disorder as claimed in claim 2, wherein the acyl derivative of lysophosphatidic acid is oleoyl lysophosphatidic acid.
4. The therapeutic agent for the corneal disorder as claimed in any one of claims 1 to 3, wherein the corneal disorder is corneal ulcer, corneal erosion, keratitis or dry eye.
5. A corneal epithelial migration promoter comprising a compound having an effect of activating Rho as an active ingredient.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

REMEDIES FOR CORNEAL DISORDERS

Description of corresponding document: **EP1142585**

Technical Field

[0001] The present invention relates to therapeutic agents for corneal disorders having effects of promoting corneal epithelial migration and containing as active ingredients compounds having effects of activating Rho such as lysophosphatidic acid and acyl derivatives thereof.

Background Art

[0002] Corneas are a transparent and avascular tissue having a diameter of about 1 cm and thickness of about 1 mm. Transparency of the cornea affects a visual function greatly. Various physiological and biochemical phenomena in the cornea function mainly for the purpose of maintaining the transparency of the cornea.

[0003] Corneal epithelial defect caused by various diseases such as corneal ulcer, corneal erosion, keratitis and dry eye is repaired naturally, unless a mixed infection coincides. However, when the repair is delayed for some reasons or the corneal epithelial defect is persisted without repair, such a delay or persistency exerts harmful influences on normal growth of the epithelium, and further constructions and functions of corneal stroma and endothelium are impaired. A conventional method of treating the corneal epithelial defect is based on a passive principle that corneal epithelium migrates naturally to re-cover defect sites by protecting the corneal surface from external stimulation. In recent years, with development of cell biology, a factor which participates in division, migration, adhesion, extension and the like of cells has been elucidated. It is reported that a compound which promotes the migration of corneal epithelium plays an important role in repairing the corneal epithelial defect (Clin. Ophthalm., 46, 738-743 (1992), Jpn. J. Ophthalm. Surg., 5, 719-727 (1992)).

[0004] Cells respond to outside signals and change a cytoskeleton and a cell adhesion mechanism greatly to adapt them to an outside environment. Main constituents forming the cytoskeleton have three types of fiber structure: a microfilament made of actin and the like, a microtubule made of tubulin and the like and an intermediate filament made of keratin and the like. These constituents perform higher-order functions such as cell adhesion, cell shape, cytokinesis and formation of cell polarity while relating closely each other.

[0005] Among them, an Rho family, which is one of subfamilies of low-molecular weight GTP-binding protein, is considered to control the actin-microfilament cytoskeleton. The Rho family consists of members such as Rho, Rac and Cdc 42 and acts downstream from extracellular signals such as cell growth factors. Recently, a target protein which is specific for Rho was identified, and regulation mechanisms of cell phenomena are going to be clarified such as a regulation mechanism of the cytoskeleton and the adhesion (Experimental Medicine, 16, 1782-1788 (1998)) and a regulation mechanism of cell movement (Experimental Medicine, 16, 2032-2039 (1998)).

[0006] On the other hand, lysophosphatidic acid and acyl derivatives thereof are known as compounds which activate Rho specifically (Cell, 70, 389-399 (1992)). Various actions were reported with regard to lysophosphatidic acid and the acyl derivatives thereof. For example, they enhance binding of fibronectin to cells and regulate cell shape (J. Cell Biol., 127, 1447-1459 (1994)). They enhance fibronectin binding to epithelial and endothelial cells in a skin wound (U.S. Pat. No. 5,480,877). They are skin activators with glycosaminoglycan production-accelerating effects, and are useful as cosmetics and external preparations to prevent skin aging (WO 95/35090). They inhibit hyperproliferation of epithelial cells resulting from psoriasis or the like (U.S. Pat. No. 5,565,439). They activate macrophages and inhibit necrosis in tumor cells (U.S. Pat. No. 5,149,527). They inhibit apoptosis and maintain or restore cell functions (WO 98/41213), etc.

[0007] In an ophthalmological field, it was reported that lysophosphatidic acid stimulates proliferation of retinal pigment epithelial cells (Curr. Eye Res., 16, 698-702 (1997)), lysophosphatidic acid sensitizes Ca ion influx in cultured lens epithelial cells (Cell. Signal., 9, 609-616 (1997)), corneal injury results in increased production of lysophosphatidic acid and acyl derivatives thereof in aqueous humor, and they

promote proliferation of normal keratocytes (Am. J. Physiol., 274, C1065-C1074 (1988)), and the like.

[0008] However, there has been no report concerning a relation between Rho and corneal epithelial cells, and it has not been known, of course, whether compounds having effects of activating Rho exhibit effects on a migration mechanism of the corneal epithelium, which is closely related to the repair of the corneal epithelial defect.

[0009] As mentioned above, it was a very interesting subject to study effects of the compounds having the effects of activating Rho, which is a low-molecular weight GTP-binding protein participating in the regulation mechanisms of the cell phenomena, on corneal disorders, particularly on the corneal epithelial migration through studies of participation of Rho in the migration mechanism of the corneal epithelium.

[0010] In order to study the participation of Rho in the migration mechanism of the corneal epithelium, the present inventors first studied effects of Rho inhibitors on the corneal epithelium. As a result, it was clarified that the corneal epithelial migration is completely inhibited by the Rho inhibitors and regulation of intracellular scaffold protein by Rho, which is the low-molecular weight GTP-binding protein, participates in the migration mechanism of the corneal epithelium.

[0011] Next, studying effects of the compounds having the Rho-activating effects, the present inventors found that the compounds have excellent effects of promoting the corneal epithelial migration.

[0012] Further, when the compounds having the Rho-activating effects and the Rho inhibitors were used jointly, the above-mentioned promotion of the corneal epithelial migration was almost completely inhibited. It was confirmed that the effects of promoting the corneal epithelial migration are based on the Rho-activating effects.

[0013] The above-mentioned results clearly show that the compounds having the Rho-activating effects have the excellent effects of promoting the corneal epithelial migration and are useful as therapeutic agents for corneal disorders such as corneal ulcer, corneal erosion, keratitis and dry eye wherein the cornea is injured from various causes.

Disclosure of the Invention

[0014] Compounds having Rho-activating effects in the present invention mean compounds which augment regulation mechanisms of cell phenomena in which Rho participates.

[0015] Lysophosphatidic acid and acyl derivatives thereof are compounds represented by the following general formula [I]:

EMI5.1

wherein R is hydrogen or acyl.

[0016] The acyl in the compounds [I] is saturated or unsaturated aliphatic carbonyl or aromatic carbonyl, preferably saturated or unsaturated aliphatic carbonyl, more preferably higher aliphatic carbonyl having six or more carbon atoms, and particularly preferred examples of the acyl are oleoyl and stearyl.

[0017] Corneal disorders in the present invention are corneal ulcer, corneal erosion, keratitis, dry eye and the like wherein cornea is injured from various causes.

[0018] In order to study participation of Rho in a migration mechanism of corneal epithelium, the present inventors studied the effects of Rho inhibitors and the compounds having the Rho-activating effects, on the corneal epithelium. Details are described in a section of "Pharmacological Tests" hereinbelow. Corneal epithelial migration was recognized to be almost completely inhibited by a C3 enzyme, which is an exoenzyme of Clostridium botulinum and is known as the Rho inhibitor (hereinafter referred to as "Exoenzyme C3") (Cell, 70, 389-399 (1992)).

[0019] This result clearly shows that Rho, which is low-molecular weight GTP-binding protein, participates in the migration mechanism of the corneal epithelium.

[0020] Next, studying effects of lysophosphatidic acid and the acyl derivatives thereof, which are typical compounds having the Rho-activating effects, on corneal epithelial migration, it was found that lysophosphatidic acid and the acyl derivatives thereof promote corneal epithelial migration in a corneal piece tissue culture system. Further, it was recognized that such corneal epithelial migration-promoting

effects are almost completely inhibited by Exoenzyme C3, and it was confirmed that the corneal epithelial migration-promoting effects of lysophosphatidic acid and the acyl derivatives thereof are based on the Rho-activating effects. These results clearly show that the compounds having the Rho-activating effects have excellent effects of promoting the corneal epithelial migration and are useful for treatment of the corneal disorders, namely corneal ulcer, corneal erosion, keratitis, dry eye and the like wherein the cornea is injured from the various causes.

[0021] The compound having the Rho-activating effect can be administered orally or parenterally. Examples of dosage forms are tablets, capsules, granules, powders, injections, eyedrops and the like, and eyedrops are particularly preferable. The compound can be formulated into preparations by general techniques. For example, eyedrops can be prepared by optionally using an isotonic agent such as sodium chloride or concentrated glycerine; a buffer such as sodium phosphate or sodium acetate; a surfactant such as polyoxyethylenesorbitan monooleate, polyoxyl 40 stearate or polyoxyethylene hydrogenated castor oil; a stabilizer such as sodium citrate or disodium edetate; a preservative such as benzalkonium chloride or paraben; or the like. pH can be in a range acceptable for ophthalmic preparations, and it is preferably in a range of 4 to 8. Eye ointments can be prepared by using a general base such as white vaseline or liquid paraffin. Oral preparations such as tablets, capsules, granules and powders can be prepared by optionally adding a diluent such as lactose, crystalline cellulose, starch or vegetable oil; a lubricant such as magnesium stearate or talc; a binder such as hydroxypropylcellulose or polyvinyl pyrrolidone; a disintegrator such as calcium carboxymethylcellulose or low-substituted hydroxypropylmethylcellulose; a coating agent such as hydroxypropylmethylcellulose, macrogol or silicone resin; a film forming agent such as gelatin film; or the like.

[0022] The dosage can be selected suitably depending on symptoms, age, dosage form and the like. In the case of eyedrops, they are instilled once to several times per day with a concentration of 0.0001 to 1% (w/v), preferably 0.001 to 1% (w/v) solution. In the case of oral preparations, the usual daily dosage is 0.1 to 5000 mg, preferably 1 to 1000 mg, which can be given in a single dose or several divided doses.

[0023] Examples of formulation and results of pharmacological tests are shown below. These examples do not limit the scope of the invention, but are intended to make the invention more clearly understandable.

Best Mode for Carrying out the Invention

Formulation

[0024] Typical examples of formulation using oleoyl lysophosphatidic acid (hereinafter referred to as "oleoyl LPA") as a compound having an Rho-activating effect are shown below.

1. Eyedrops

[0025] Eyedrops having the following formulation were prepared by a general method.

<tb><TABLE> Columns=2
<tb>Title: Formulation 1 (ophthalmic solution)
<tb>
<tb>Head Col 1 to 2 AL=L: In 100 ml
<tb>Oleoyl LPA<SEP>1 mg
<tb>Sodium chloride<SEP>900 mg
<tb>Sodium hydroxide<SEP>q.s.
<tb>Hydrochloric acid<SEP>q.s.
<tb>Sterile purified water<SEP>q.s.
<tb></TABLE>

[0026] Ophthalmic solutions containing 5 mg, 10 mg, 50 mg, 100 mg, 500 mg and 1000 mg of oleoyl LPA in 100 ml can be prepared by optionally adding a surfactant or a stabilizer by a method similar to Formulation 1.

<tb><TABLE> Columns=2
<tb>Title: Formulation 2 (eye ointment)
<tb>

<tb>Head Col 1 to 2 AL=L: In 100 g
<tb>Oleoyl LPA<SEP>100 mg
<tb>White vaseline<SEP>90 g
<tb>Liquid paraffin<SEP>q.s.
<tb></TABLE>

[0027] Eye ointments containing 1 mg, 5 mg, 10 mg and 50 mg of oleoyl LPA can be prepared by a method similar to Formulation 2.

<tb><TABLE> Columns=2
<tb>Title: Formulation 3 (tablet)
<tb>
<tb>Head Col 1 to 2 AL=L: In 100 mg
<tb>Oleoyl LPA<SEP>10 mg
<tb>Lactose<SEP>59.4 mg
<tb>Cornstarch<SEP>20 mg
<tb>Calcium carboxymethylcellulose<SEP>6 mg
<tb>Hydroxypropylcellulose<SEP>4 mg
<tb>Magnesium stearate<SEP>0.6 mg
<tb></TABLE>

[0028] Desired coated tablets can be obtained by coating tablets according to the formulation as above with 2 mg/tablet of a coating agent such as hydroxypropylcellulose.

[0029] Tablets containing 0.1 mg, 0.5 mg, 1 mg, 5 mg and 50 mg of oleoyl LPA in 100 mg can be obtained by a method similar to Formulation 3.

Pharmacological Tests

Effect on corneal epithelial migration (in vitro)

[0030] Effects of the following test compounds on corneal epithelial migration were studied using cornea of a male Japanese white rabbit by using corneal epithelial migration length in a corneal piece tissue culture system as an index according to the method of Nishida et al. (J. Cell Biol., 97, 1653-1657 (1983)).

Experimental method

[0031] A corneal block isolated from a corneal piece of a rabbit was cultured for 24 hours in a culture medium (TC-199) containing the test compound under a condition of 37 DEG C-5% CO₂. After the culture, the corneal block was fixed in a mixed liquid of ethanol-glacial acetic acid (volume ratio 95:5) and embedded with paraffin to prepare a section. Removing the paraffin from the section, the section was stained with hematoxylin-eosin, and migration length of an epithelial cell layer was measured under a microscope.

[0032] A corneal block cultured similarly in a culture medium containing no test compound was used as a control.

Result 1

[0033] Table 1 shows a result obtained by culturing the corneal block in a culture medium containing Exoenzyme C3, which is an Rho inhibitor, as the test compound.

<tb><TABLE> Id= Table 1 Columns=2
<tb>
<tb>Head Col 1:
<tb>Head Col 2: Migration length (μ m)
<tb><SEP>Control<SEP>454
<tb><SEP>Exoenzyme C3 (2 μ g/ml)<SEP>186

<tb><SEP>(Each datum in the table is an average of six samples.)
<tb></TABLE>

[0034] Table 1 clearly shows that when the corneal block is cultured in the culture medium containing Exoenzyme C3, which is the Rho inhibitor, the corneal epithelial migration is almost completely inhibited, and Rho participates in the corneal epithelial migration.

Result 2

[0035] Table 2 shows results obtained by culturing the corneal block in a culture medium containing oleoyl LPA as the test compound at concentrations of 0.02 μ M, 0.2 μ M and 2 μ M respectively.

<tb><TABLE> Id= Table 2 Columns=2
<tb>
<tb>Head Col 1:
<tb>Head Col 2: Migration length (μ m)
<tb>Control<SEP>454
<tb>Oleoyl LPA (0.02 μ M)<SEP>528
<tb>(0.2 μ M)<SEP>658
<tb>(2 μ M)<SEP>712

(Each datum in the table is an average of six samples.)
<tb></TABLE>

[0036] Table 2 shows that when the corneal block is cultured in the culture medium containing oleoyl LPA, the corneal epithelial migration is remarkably promoted concentration dependently.

Result 3

[0037] Table 3 shows results obtained by adding Exoenzyme C3 to the culture medium together with oleoyl LPA as the test compounds.

<tb><TABLE> Id= Table 3 Columns=2
<tb>
<tb>Head Col 1:
<tb>Head Col 2: Migration length (μ m)
<tb>Control<SEP>454
<tb>Exoenzyme C3 (2 μ g/ml)
<tb>+ Oleoyl LPA (0.02 μ M)<SEP>185
<tb>+ Oleoyl LPA (0.2 μ M)<SEP>182
<tb>+ Oleoyl LPA (2 μ M)<SEP>198

(Each datum in the table is an average of six samples.)
<tb></TABLE>

[0038] Table 3 shows that when Exoenzyme C3, which is the Rho inhibitor, is added to the culture medium together with oleoyl LPA, the corneal epithelial migration is almost completely inhibited.

[0039] These results confirm that the corneal epithelial migration-promoting effect is based on the Rho-activating effect.

[0040] The above-mentioned pharmacological tests show that the compound having the Rho-activating effect has the excellent effects of promoting corneal epithelial migration and is useful as a therapeutic agent for corneal disorders such as corneal ulcer, corneal erosion, keratitis and dry eye wherein the cornea is injured from various causes, through an effect of promoting wound healing of the corneal epithelium.

Industrial Applicability

[0041] The present invention relates to therapeutic agents for corneal disorders containing compounds

having Rho-activating effects as active ingredients, for example corneal epithelial migration promoters.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide